

EUROPEAN PATENT OFFICE

D 5

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 2001158736
PUBLICATION DATE : 12-06-01

APPLICATION DATE : 30-11-99
APPLICATION NUMBER : 11340211

APPLICANT : SNOW BRAND MILK PROD CO LTD;

INVENTOR : AOE SEIICHIRO;

INT.CL. : A61K 31/164 A23L 1/30 A61K 31/688 A61K 31/7032 A61P 19/00 A61P 19/10

TITLE : AGENT FOR PREVENTING AND IMPROVING OSTEOARTROPATHY

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an agent for preventing and improving osteoarthropathy such as osteoporosis, fracture, lumbago and rheumatism, and to provide a drink, food or feed to which an effect for preventing and improving the osteoarthropathy is imparted.

SOLUTION: This agent for preventing or improving the osteoarthropathy, containing a sphingosine skeleton-having compound such as ceramide, sphingomyelin, a sphingoglycolipid or ganglioside as an active ingredient, or containing the sphingosine skeleton-having compound and further suitably one or more substances selected from calcium agents, vitamin D and vitamin K.

COPYRIGHT: (C)2001,JPO

JP2001158736

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The prevention and the improvement agent of a bone and joint disease which make an active principle the compound which has a sphingosine frame.

[Claim 2] The prevention and the improvement agent of a bone and joint disease according to claim 1 whose compound which has a sphingosine frame is ceramide, sphingomyelin, sphingoglycolipid, or ganglioside.

[Claim 3] Furthermore, the prevention and the improvement agent containing the matter more than a kind chosen from calcium preparations, vitamin D, and a vitamin K of a bone and joint disease according to claim 1 or 2.

[Claim 4] The eating-and-drinking article or feed which blended the compound which has a sphingosine frame and granted prevention and the improvement effect of a bone and joint disease.

[Claim 5] Furthermore, the eating-and-drinking article according to claim 4 or feed which blended the matter more than a kind chosen from calcium preparations, vitamin D, and a vitamin K.

[Translation done.]

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the prevention and the improvement agent of a bone and joint disease which make an active principle the compound which has a sphingosine frame. Moreover, this invention relates to the eating-and-drinking article or feed which blended the compound which has a sphingosine frame and granted prevention and the improvement effect of a bone and joint disease.

[0002]

[Description of the Prior Art] In recent years, bone and joint diseases, such as osteoporosis, fracture, low back pain, and rheumatism, are increasing with aging. In an osseous tissue, although osteogenesis and osteoclasia are performed continuously, and osteogenesis and osteoclasia can be balanced when young, in connection with aging, the balance inclines to osteoclasia from various causes. And when this condition continues for a long period of time, an osseous tissue becomes weak and will produce bone and joint diseases, such as osteoporosis, fracture, and low back pain. If this uncoupling can be prevented, it is thought that bone and joint diseases, such as osteoporosis, fracture, and low back pain, can be prevented. Moreover, from inflammation, since rheumatism is finally a disease accompanied by osteoclasia, it is considered that it can prevent and improve rheumatism by controlling osteoclasia.

[0003] It is (1), preventing uncoupling and using various bone and joint diseases as the approach of preventing and improving conventionally. Supply of the calcium by the

meal, and (2) Light movement and (3) A sun bath and (4) Medication etc. is performed. Natural calcium preparations, such as calcium salts, such as a calcium carbonate and calcium phosphate, cow bone powder, an egg shell, and fishbone powder, are usually used for supply of the calcium by the meal of 1. About light movement of 2, although light running, a light walk, etc. are made good, if light movement will also become troublesome if the body has weakened, furthermore it becomes a bedridden old man, it can hardly exercise. Moreover, a sun bath of 3 is activation vitamin D3. In that supply is complemented although it is good, a problem at large [in connection with various bone and joint diseases] cannot necessarily be solved. Furthermore, as medication of 4, it is known that the 1alpha-hydroxyvitamin D 3, calcitonin pharmaceutical preparation, etc. are effective in the therapy and improvement of osteoporosis. However, calcitonin pharmaceutical preparation is the hormone preparation as drugs, and the present condition is that the matter which can take in like a food material every day, and prevents and improves various safe bone and joint diseases is not examined.

[0004]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Bone and joint diseases, such as osteoporosis, fracture, low back pain, and rheumatism, are big social problems, and the method of preventing and improving these symptoms is searched for so that it may describe above. this invention persons found out that the effectiveness of preventing and improving various bone and joint diseases was in the compound which has sphingosine frames, such as ceramide contained in cow's milk or a bovine brain, sphingomyelin, sphingoglycolipid, and ganglioside, the place which has advanced research wholeheartedly so that they may get the matter which has prevention and the improvement effect of various bone and joint diseases. And it came to complete a header and this invention for the effectiveness increasing by adding calcium preparations, vitamin D, and a vitamin K. Therefore, this invention makes it a technical problem to offer the prevention and the improvement agent of the above-mentioned bone and joint disease which added the matter more than a kind chosen from offering the prevention and the improvement agent of a bone and joint disease which make an active principle the compound which has a sphingosine frame and calcium preparations, vitamin D, and a vitamin K. Moreover, this invention makes it a technical problem to offer the above-mentioned eating-and-drinking article or the feed which added the matter more than a kind chosen from offering the eating-and-drinking article or feed which blended the compound which has a sphingosine frame and granted prevention and the improvement effect of a bone and joint disease and calcium preparations, vitamin D, and a vitamin K.

[0005]

[Means for Solving the Problem] In this invention, the compound which has sphingosine frames, such as ceramide, sphingomyelin, sphingoglycolipid, and ganglioside, is used as prevention of a bone and joint disease, and an active principle of an improvement agent. Moreover, in this invention, the compound which has sphingosine frames, such as ceramide, sphingomyelin, sphingoglycolipid, and ganglioside, is blended with an eating-and-drinking article or feed, and prevention and the improvement effect of a bone and joint disease are granted. Sphingosine is one sort of the long chain base which constitutes sphingolipid, and is widely distributed in a living body. Sphingosine is in the living body, it carried out acid-amide association with the fatty acid, constituted ceramide, and has accomplished the frame of sphingolipid.

[0006] Sphingolipid is a component which constitutes a cell membrane and the most exists as sphingoglycolipid or sphingophospholipid. Many sphingolipid to a brain, a nervous system, or an erythrocyte is contained. Moreover, although contained also in various food, it is contained mostly especially in cow's milk. Very many reports have been made about the physiological function of sphingolipid until now. For example, it is checking sphingosine protein-kinase C, having the operation which promotes differentiation of monocyte or a macrophage system cell, having the operation which adjusts the function of an epidermal growth factor (EGF) receptor, etc. Moreover, ganglioside is applied also to the therapy of a brain ischemia failure or the brain disorder by Parkinson's disease also in sphingolipid.

[0007] A coal chemical product and the thing of the animals-and-plants origin should just be used for compounds, such as ceramide of a compound which has a sphingosine frame, sphingomyelin, sphingoglycolipid, and ganglioside. And since these compounds are contained in cow's milk, a bovine brain, etc., they can use cow's milk and bovine brains, such as fresh milk, milk powder, a skimmilk, and recombined milk, as a raw material, and can obtain them by processing various chromatographies, such as heating, salting, a fortification of alcohol, ion exchange chromatography, and gel filtration chromatography, an ultrafiltration (UF), etc. In addition, since it has thermal stability, in case it blends with an eating-and-drinking article, feed, etc. especially, the compound which has a sphingosine frame is dealt with extremely, and it is easy to carry out it. Moreover, in this invention, in order to heighten prevention of the bone and joint disease which makes an active principle the compound which has the above-mentioned sphingosine frame, and the effectiveness of an improvement agent, the matter more than a kind chosen from calcium preparations, vitamin D, and a vitamin K is added. Moreover, in this invention, in order to heighten the effectiveness of the eating-and-drinking article which blended the compound which has the above-mentioned sphingosine frame, and granted prevention and the improvement effect of a bone and joint disease, or feed, the matter more than a kind chosen from calcium preparations, vitamin D, and a vitamin K is added. It is desirable to use the good calcium salt of absorptivity as calcium preparations used by this invention, for example, although calcium salts, such as a calcium chloride, a calcium carbonate, and a calcium lactate, an egg shell, or the calcium content constituent of the cow's milk origin can be mentioned. Moreover, it is desirable to blend a component effective in bones, such as vitamin D and a vitamin K. The compound and operation mechanism which have a sphingosine frame differ from each other, and such calcium preparations and vitamins take effect in multiplication to a bone.

[0008]

[Embodiment of the Invention] In this invention, prevention and the improvement agent of a bone and joint disease are prepared by making into an active principle compounds, such as a coal chemical product or ceramide which has cow's milk and the sphingosine frame of the bovine brain origin, sphingomyelin, sphingoglycolipid, and ganglioside, the matter more than a kind chosen from calcium preparations, vitamin D, and a vitamin K is added further, and prevention and the improvement agent of a bone and joint disease are prepared. Moreover, in this invention, the eating-and-drinking article or feed which blended compounds, such as a coal chemical product or ceramide which has cow's milk and the sphingosine frame of the bovine brain origin, sphingomyelin, sphingoglycolipid, and ganglioside, and granted prevention and the improvement effect of a bone and joint

disease is prepared, the matter more than a kind chosen from calcium preparations, vitamin D, and a vitamin K is added further, and the eating-and-drinking article or feed which granted prevention and the improvement effect of a bone and joint disease is prepared.

[0009] In this invention, bone and joint diseases, such as osteoporosis, fracture, low back pain, and rheumatism, can be prevented and improved by taking in 1 micro per one adult day g-10mg for the compound which has a sphingosine frame in several steps. Therefore, what is necessary is just to blend with an eating-and-drinking article or feed the compound which has a sphingosine frame so that those amounts can be taken in. furthermore, the matter more than a kind chosen from calcium preparations, vitamin D, and a vitamin K -- suitable ***** things can raise prevention and the improvement effect of a bone and joint disease. In addition, as an eating-and-drinking article, cow's milk, a milk beverage, juice, jelly, a biscuit, a pan, noodles, a sausage, etc. can be mentioned, for example. Next, an example and the example of a trial are shown and this invention is explained to a detail.

[0010]

[The example 1 of reference] Preparation of the ganglioside of the cow's milk origin; the well-known ganglioside method of preparation (Provisional-Publication-No. 63 No. - 369992 official report) It followed and the ganglioside of the cow's milk origin was prepared. That is, after making the trypsin of a proteolytic enzyme act on the milk quality matter containing ganglioside at 40 degrees C for 15 hours and disassembling protein, the obtained proteolysis object solution was dialyzed by the film of the molecular weight fractionation 10,000, and the ganglioside quantity content fraction was obtained. After freeze-drying this ganglioside quantity content fraction, it dissolved in the chloroform-methanol (1:1) solution, this solution was dipped in anion exchange resin (a DEAE-Sephadex acetate mold, Pharmacia manufacture), and ganglioside was made to adsorb. Next, after the chloroform-methanol (1:1) solution washed anion exchange resin, ganglioside was eluted with the 0.1M sodium acetate water-solution-methanol solution. And it dialyzed, desalting and freeze-dried, after carrying out reduced pressure hardening by drying of the eluate. Thus, when thin-layer chromatography (the resorcinol method) detected the obtained ganglioside fraction (fraction A), it was the ganglioside GM3:ganglioside GD3:ganglioside GT 3= 10:90:1. Furthermore, fractionation of the fraction A was carried out. namely, chloroform-methanol (8:8 (v/v)) a solution -- Fraction A -- suspending -- a silica gel (Iatrobeads, product made from iatron laboratory) column -- adding -- 8:2 (v/v) from -- 2:8 (v/v) up to -- gradient elution was carried out with the chloroform-methanol solution, and fractionation was carried out to ganglioside GM3 fraction (fraction B), ganglioside GD3 fraction (fraction C), and ganglioside GT3 fraction (fraction D). Thus, when thin-layer chromatography (the resorcinol method) detected each obtained ganglioside fraction, purity was 95% or more.

[0011]

[The example 2 of reference] Preparation of the ganglioside of the bovine brain origin; the ganglioside of the bovine brain origin was prepared according to the ganglioside method of preparation currently generally performed widely. That is, it extracts immediately after slaughter, after freeze-drying 5kg of bovine brains saved at -20 degrees C, it considers as coarse powder by the mixer, and it is a methanol. 10 l In addition, it heated at 60 degrees C, and was left for 30 minutes, and the fraction containing

ganglioside was extracted and the filtrate obtained by carrying out suction filtration immediately was left at -10 degrees C after the extract overnight, and suction filtration of the generated precipitation is carried out quickly, and it is collected -- after carrying out Folch distribution, vacuum concentration of the upper layer was carried out, and it freeze-dried. Thus, the obtained fraction is processed with a silica gel column chromatography, neutral lipid and sulfatide are separated, and it is 4.87g (fraction E) of ganglioside fractions. It obtained. Thus, ganglioside GD1a, ganglioside GM 1, ganglioside GD1b, ganglioside GT1b, etc. were contained in the obtained fraction E. Furthermore, fractionation of the fraction E was carried out. Namely, Q-Sepharose To a column, it is a chloroform-methanol-water (30:60:8) solution. The fraction E which dissolved in 500ml is added. Chloroform-methanol-water (30:60:8) solution From 3 l to a chloroform-methanol-4M sodium acetate water-solution (30:60:8) solution Gradient elution is carried out even by 3 l. One a(fraction F) 1,220mg of gangliosides GD, ganglioside GM1102(fraction G) mg, one b451 (fraction H)mg of gangliosides GD, and one b540 (fraction I)mg of gangliosides GT were obtained.

[0012]

[The example 3 of reference] Preparation of the sphingomyelin of the cow's milk origin; sphingomyelin was prepared from cow's milk. That is, it is methanol 90 l at 60 degrees C about this after freeze-drying butter SERAMU 10kg discharged in case butter oil is manufactured. It dissolved. After leaving it at a room temperature for 12 hours, vacuum concentration of the supernatant liquid was collected and carried out, and the methanol was removed so that the generated precipitation might not mix. It is deionized water about the obtained solid. 10 l After dissolving, the ultrafiltration was carried out, the low-molecular fraction was removed, it freeze-dried and the macromolecule fraction was obtained. This macromolecule fraction was 600g and the sphingomyelin content contained in this macromolecule fraction was 15.2%. Furthermore, in order to refine sphingomyelin, the silica gel column chromatography refined. Namely, silica gel column 10 l Chloroform which dissolved 500g of macromolecule fractions containing sphingomyelin: The methanol (9:1) solution was added. And methanol concentration was raised, gradient elution was carried out, and 37.3g (fraction J) of sphingomyelin fractions was obtained. Thus, the obtained sphingomyelin fraction was 98% or more of purity.

[0013]

[The example 4 of reference] Preparation of the ceramide of the cow's milk origin; ceramide was prepared from the ganglioside fraction (fraction A) obtained in the example 1 of reference. That is, fraction A 20g is received in the acetic-acid buffer solution (pH 5.5). Endoglycoceramidase(TAKARA SHUZO CO., LTD. make)500U was added, and it was made to react for 12 hours. After the reaction, the Folch distribution of the reaction mixture were carried out, lipid fractions were collected, and the anion-exchange-resin column chromatography removed the glycolipid. And an octadecyl silyl column chromatography refines a ceramide part, and nitrogen was sprayed and it was made to harden by drying. Thus, 6g (fraction K) of ceramide fractions was obtained. This ceramide fraction was 98% or more of purity.

[0014]

[The example 1 of a trial] Osteoclastis depressor effect of the compound which has a sphingosine frame; after extracting the long long bone of the ICR system mouse of ten to after-the-birth 20 age in day and removing tissue, the fragment of the bone was

mechanically carried out in the alpha-MEM solution which contains fetal calf serum 5%, and all the bone marrow cells containing an osteoclast were obtained. On the piece of ivory, it is this cell About 2×10^6 The spot of the cell was carried out with the alpha-MEM solution which contains fetal calf serum 5%. Compound which has a sphingosine frame several hours after The alpha-MEM solution containing added 5% fetal calf serum was added so that it might become 50 ng/ml concentration, and it cultivated for five days at 37 degrees C under 5% carbon-dioxide existence, and the osteoclast activity of an osteoclast was investigated. The haematoxylin stain of ivory Kataue's cell is removed and carried out after culture, image analysis is carried out with image-analysis equipment (PIASLA-555, product made from PIAS), and it is the osteoclast socket (pit). The number was measured. And the osteoclast activity (%) defined by the degree type was searched for, and osteoclast depressor effect was evaluated.

osteoclast activity (%) = (number of osteoclast socket of number of osteoclast socket / additive-free group) $\times 100$ -- in addition as a compound which has a sphingosine frame, fraction A-K obtained in the examples 1-4 of reference was used. The result is shown in Table 1.

[0015]

[Table 1]

-----	- test sample Osteoclast activity (%), **SD)
-----	Fraction A 53.4 **7.8 fraction B The 56.5**8.4 fraction C The 46.8**5.7 fraction D 67.6 **4.5 fraction E 54.3 **7.5 fraction F 51.5 **6.4 fraction G 57.3 **5.1 fraction H 50.6 **4.8 fraction I 65.3 **3.4 fraction J 42.3 **4.6 fraction K 50.5**3.9 -----
-----	[0016] When cultivated by the culture medium which added the compound which has a sphingosine frame, compared with the time of cultivating by the additive-free culture medium, osteoclast is controlled and it has checked that the osteoclast depressor effect excellent in the compound which has a sphingosine frame was shown.

[0017]

[The example 2 of a trial] Osteoclast prevention and bone potentiation of a compound which have a sphingosine frame; the osteoclast prevention effectiveness was investigated by the administration trial which used the osteoporosis model rat about the fraction J obtained in the fraction A obtained in the example 1 of reference, and the example 3 of reference. Moreover, it is the calcium preparations (milk calcium: refer to JP,4-306622,A) and vitamin D (VD) of the good cow's milk origin of absorptivity to Fractions A and J. 200IU was added and the same trial was performed. The presentation of the feed with which the trial animal was medicated added the compound which has a sphingosine frame if needed in the raw material which blended each component, as shown in Table 2. Both the amounts of calcium and amounts of Lynn in feed are per 100g of feed at all groups. It is made to be set to 300mg and the calcium:Lynn ratio was set to 1:1. And this feed It examined by adding 0.3%.

[0018]

[Table 2]

-----	A fraction Fraction + milk calcium2+VD3 contrast Siam --
-----	A J A J ----- sucrose 50.0 50.0 50.0 50.0 50.0
50.0	Casein 20.0 20.0 18.0 18.0 18.0 Corn starch 15.0 15.0 15.0 15.0 15.0
Cellulose 5.0 5.0 5.0 5.0 5.0 Corn oil 5.0 5.0 5.0 5.0 Vitamin mixing 1.0 1.0 1.0	

1.0 1.0 1.0 (choline ****)

Mineral mixing 4.0 1 4.0 1 4.0 1 4.0 1 4.0 2 4.0 2 ----- (unit:
g/100g)

Fraction A - - 0.0001 - 0.0001 - Fraction J - - - 0.0001 - 0.0001-----
---- (unit: % of the weight)

[0019] 1) The calcium carbonate was made into the source of calcium.

2) Calcium preparations of the cow's milk origin were made into the source of calcium.

3) Vitamin D 200IU was blended.

As a trial animal, 32-weeks old SD system feminity rat was used. The osteoporosis model rat gave ovariectomy, after carrying out preliminary breeding for one week, and it created it by breeding for two months by low calcium diet. Moreover, the false operation was performed and seven Siam rats which do not extract the ovary were also created. The administration trial was performed in seven 1 trial groups by prescribing the test meal of a group part opium poppy and Table 2 for the patient for one month. The femur of the rat of each experimental group was extracted after test meal administration, the bone mineral content was measured with the bone mineral content measuring device, and bone reinforcement was measured with the fracture property measuring device. The result is shown in Table 3 and 4.

[0020]

[Table 3]

[Table 13]

----- yogurt mix 97.0 (% of the weight)

Culture (L. bulgaricus) 1.5 cultures (S. thermophilus) 1.5----- [0043]

[Example 7] Manufacture of dog food; 0.0002 % of the weight of gangliosides of the cow's milk origin was added to the raw material of combination of Table 14, it mixed, and the dog food (feed for dog breeding) which granted prevention and the improvement effect of a bone and joint disease was manufactured.

[0044]

[Table 14]

----- soybean cake 12.0 (% of the weight)

Skimmilk powder 14.0 soybean oil 4.0 corn oil 2.0 palm oil 28.0 amyllum maydis 15.0

wheat flour 9.0 wheat bran 2.0 vitamin mixture 9.0 mineral mixture 2.0 celluloses 3.0-----

[0045]

[Effect of the Invention] Prevention and the improvement agent of bone and joint diseases, such as osteoporosis, fracture, low back pain, and rheumatism, can be offered by making into an active principle the compound which has sphingosine frames, such as ceramide, sphingomyelin, sphingoglycolipid, and ganglioside. Moreover, the eating-and-drinking article or feed which granted prevention and the improvement effect of bone and joint diseases, such as osteoporosis, fracture, low back pain, and rheumatism, can be offered by blending the compound which has sphingosine frames, such as ceramide, sphingomyelin, sphingoglycolipid, and ganglioside. Furthermore, each effectiveness can be heightened adding calcium preparations, vitamin D, and a vitamin K to the above-mentioned prevention and the above-mentioned improvement agent of a bone and joint disease, or by adding calcium preparations, vitamin D, and a vitamin K to the eating-and-drinking article or feed which granted the above-mentioned prevention and the above-mentioned improvement effect of a bone and joint disease.

[0021] As shown in Table 3, the bone mineral content of a femur showed the high value intentionally statistically by Fraction A and J group compared with the control group. This showed that there was the osteoclasia prevention effectiveness in the compound which has a sphingosine frame. Moreover, by adding the good milk calcium and the vitamin D of absorptivity showed that the effectiveness increased further.

[0022]

[Table 4]

----- Bone fracture force (106 dyn)
----- Siam 12.8 ** 2.9* Contrast 6.4 ** 1.7 Fraction A 8.2 ** 1.5*
Fraction J 8.4 ** 1.9* Fraction A+ milk calcium+VD 9.1 ** 2.1* Fraction J+ milk
calcium+VD 9.5 ** 2.4* ----- * They are those with a significant
difference to a control group. ($P < 0.05$) [0023] As shown in Table 4, the fracture force of a femur showed the high value intentionally statistically by Fraction A and J group compared with the control group. This showed that there was bone potentiation in the compound which has a sphingosine frame. Moreover, by adding the good milk calcium and the vitamin D of absorptivity showed that the effectiveness increased further. In addition, it was the same result, even if it replaced with vitamin D and added the vitamin K.

[0024]

[The example 3 of a trial] 0.000008 % of the weight of gangliosides and vitamin D 200IU of the cow's milk origin were added to the raw material of combination of Table 5, it mixed, the container was filled up, it heat-sterilized, and the drink was manufactured. In addition, it is albumin 0.00005 to the raw material of combination of Table 5 in a control group. Weight % and vitamin D 200IU was added.

[0025]

[Table 5]

----- cryatalline glucose 15.0 (% of the weight)
Calcium 0.5 water 74.0----- [0026] Osteoarthritis (contraction of the cleavage of a joint) Ten persons divided at a time into two groups by making 20 female patients into a volunteer, I had the above-mentioned drink drunk for one month, and the amount of deoxy pyridino phosphorus in urine which is the bone metabolic turnover marker of osteoclasia was measured and evaluated a drink initiation front and after drink termination. Moreover, an oral consultation was given and change of a symptom was

investigated. The result is shown in Table 6 and 7.

[0027]

[Table 6]

----- deoxy pyridino phosphorus decrement (nM/mM Cr) -----
----- A control group 0.35 ** 0.4 Trial group 0.84 ** 0.3* ----- *
They are those with a significant difference ($P < 0.05$) to a control group. [0028] Although the amount of deoxy pyridino phosphorus was decreasing also in the control group which blended calcium and a vitamin as shown in Table 6, by the trial group, it was decreasing still more greatly. By drinking the drink which blended the compound which has a sphingosine frame from this result showed that the osteoclasia by bony destruction was very often stopped.

[0029]

[Table 7]

----- A control group A trial group ----- Before initiation
After termination Before initiation After termination ----- The
arthralgia of physical pressure 10 9 10 10 Arthralgia at the time of actuation 5 5 5 1
Arthralgia at the time of sleeping 6 6 7 4 Arthralgia at the time of fatigue 9 8 8 4 Sense of
exhaustion 6 6 7 2 Arthralgia of the whole cleavage 9 8 9 4 -----
(unit: a man / ten persons)

[0030] As shown in Table 7, by drinking the drink which blended the compound which has a sphingosine frame also about the arthralgia showed that the pain had mitigated. In addition, the same inclination was seen also with the cheese head which blended the compound which has a sphingosine frame.

[0031]

[Example 1] Manufacture of a drink; ganglioside 0.00005 of the cow's milk origin in the raw material of combination of Table 8 Weight % and vitamin D 200IU were added, it mixed, the container was filled up, it heat-sterilized, and the drink which granted prevention and the improvement effect of a bone and joint disease was manufactured.

[0032]

[Table 8]

----- mixed isomerism-ized sugar 15.0 (% of the weight)
Fruit juice 10.0 citric acids 0.5 perfume 0.1 calcium 0.5 water 73.9-----

[0033]

[Example 2] Manufacture of a tablet; 0.0001 % of the weight of gangliosides, vitamin D of the cow's milk origin in the raw material of combination of Table 9 200IU was added, it mixed, pressurization molding was carried out, and the tablet which granted prevention and the improvement effect of a bone and joint disease was manufactured.

[0034]

[Table 9]

----- Hydrated crystal grape sugar 93.5 (% of the weight)
Calcium 5.0 Sugar ester 1.0 Perfume 0.5----- [0035]

[Example 3] Manufacture of a biscuit; ganglioside 0.00001 of the bovine brain origin in the raw material of combination of Table 10 Weight % was added and it mixed, and after creating and casting dough, calcining was carried out and the biscuit which granted prevention and the improvement effect of a bone and joint disease was manufactured.

[0036]

[Table 10]

----- wheat flour 50.0 (% of the weight)
Sugar 20.0 salt 0.5 margarine 12.5 eggs 12.5 water 3.7 sodium hydrogencarbonates 0.1
ammonium bicarbonates 0.2 calcium carbonates 0.5----- [0037]

[Example 4] Manufacture of jelly; sphingomyelin 0.00001 of the cow's milk origin in the raw material of combination of Table 11 After having added weight %, mixing and filling up a container, it heat-sterilized and the jelly which granted prevention and the improvement effect of a bone and joint disease was manufactured.

[0038]

[Table 11]

----- Fruit sugar 20.0 (% of the weight)
Granulated sugar 15.0 Starch syrup 5.0 Agar 1.0 Perfume 0.1 Calcium 0.1 Water 58.8----
----- [0039]

[Example 5] Manufacture of process cheese; 0.0001 % of the weight of gangliosides of the cow's milk origin was added to the raw material of combination of Table 12, and it mixed, it emulsified at the emulsification temperature of 85 degrees C, and the process cheese which granted prevention and the improvement effect of a bone and joint disease was manufactured.

[0040]

[Table 12]

----- Gouda 43.0 (% of the weight)
Cheddar cheese 43.5 sodium citrates Calcium of the 2.0 cow's-milk origin 1.0 water 10.5----
----- [0041]

[Example 6] After heat-sterilizing for 20 minutes at 90 degrees C to a skimmilk 12%, the Lactobacillus DERUBURUKKI subspecies bulgaricus (*L. delbrueckii* subsp.*bulgaricus*) and Streptococcus thermophilus (*S. thermophilus*) were inoculated, respectively, and two kinds of starter cultures were acquired. And it is the ganglioside 0.00001 of the bovine brain origin in the raw material of combination of Table 13, using as a principal component the yogurt mix which makes cow's milk a subject. After adding weight % and mixing, fermentation cooling was performed according to the conventional method, and the yogurt which granted prevention and the improvement effect of a bone and joint disease was manufactured.

[0042]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-158736

(P2001-158736A)

(43)公開日 平成13年6月12日(2001.6.12)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テ-マ-ト^{*}(参考)

A 6 1 K 31/164

A 6 1 K 31/164

4 B 0 1 8

A 2 3 L 1/30

A 2 3 L 1/30

Z 4 C 0 8 6

A 6 1 K 31/688

A 6 1 K 31/688

4 C 2 0 6

31/7032

31/7032

A 6 1 P 19/00

A 6 1 P 19/00

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 8 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号

特願平11-340211

(71)出願人 000006699

雪印乳業株式会社

北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

(22)出願日

平成11年11月30日(1999.11.30)

(72)発明者 高田 幸宏

埼玉県川越市小堤62-22

(72)発明者 松原 篤宜

北海道札幌市白石区中央2条7-5-6光

シティーIIB-8

(72)発明者 柳平 修一

埼玉県鶴ヶ島市富士見5-2-4

(74)代理人 100105061

弁理士 児玉 喜博

最終頁に統く

(54)【発明の名称】骨関節疾患の予防及び改善剤

(57)【要約】

【課題】骨粗鬆症、骨折、腰痛、リウマチなどの骨関節疾患の予防及び改善剤、あるいは骨関節疾患の予防及び改善効果を賦与した飲食品又は飼料の提供。

【解決手段】セラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質、ガングリオシドなどのスフィンゴシン骨格を有する化合物を有効成分とし、あるいはスフィンゴシン骨格を有する化合物を配合し、さらに、適宜、カルシウム剤、ビタミンD及びビタミンKから選ばれる一種以上の物質を加えることによって、骨関節疾患の予防及び改善効果を得る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 スフィンゴシン骨格を有する化合物を有効成分とする骨関節疾患の予防及び改善剤。

【請求項2】 スフィンゴシン骨格を有する化合物が、セラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質又はガングリオシドである請求項1記載の骨関節疾患の予防及び改善剤。

【請求項3】 さらに、カルシウム剤、ビタミンD及びビタミンKから選ばれる一種以上の物質を含有する請求項1又は2記載の骨関節疾患の予防及び改善剤。

【請求項4】 スフィンゴシン骨格を有する化合物を配合して骨関節疾患の予防及び改善効果を賦与した飲食品又は飼料。

【請求項5】 さらに、カルシウム剤、ビタミンD及びビタミンKから選ばれる一種以上の物質を配合した請求項4記載の飲食品又は飼料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、スフィンゴシン骨格を有する化合物を有効成分とする骨関節疾患の予防及び改善剤に関する。また、本発明は、スフィンゴシン骨格を有する化合物を配合して骨関節疾患の予防及び改善効果を賦与した飲食品又は飼料に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、高齢化に伴い、骨粗鬆症、骨折、腰痛及びリウマチなどの骨関節疾患が増加している。骨組織においては、絶えず骨形成と骨吸収が當まれており、若い時には骨形成と骨吸収のバランスがとれているが、加齢に伴い種々の原因からそのバランスが骨吸収に傾いてくる。そして、この状態が長期間続くと骨組織が脆くなり、骨粗鬆症、骨折及び腰痛などの骨関節疾患を生じることになる。このアンカッピングを防ぐことができれば、骨粗鬆症、骨折及び腰痛などの骨関節疾患を予防できると考えられている。また、リウマチは、炎症から最終的に骨吸収を伴う疾患であることから、骨吸収を抑制することでリウマチを予防及び改善することができると考えられている。

【0003】 従来より、アンカッピングを防ぎ、各種骨関節疾患を予防及び改善する方法として、(1) 食事によるカルシウムの補給、(2) 軽い運動、(3) 日光浴、(4) 薬物治療などが行われている。1の食事によるカルシウムの補給には、通常、炭酸カルシウム、リン酸カルシウムなどのカルシウム塩や牛骨粉、卵殻、魚骨粉などの天然カルシウム剤が使用されている。2の軽い運動については、軽いランニングや散歩などが良いとされるが、体が弱っていると軽い運動もやっかいなものとなり、まして寝たきりの老人になると殆ど運動することはできない。また、3の日光浴は、活性化ビタミンD₃の補給を補完するという点では良いとされているが、各種骨関節疾患に関わる問題全般を解決できるわけではな

い。さらに、4の薬物治療としては、1 α-ヒドロキシビタミンD₃、カルシトニン製剤などが骨粗鬆症の治療及び改善に有効であることが知られている。しかし、カルシトニン製剤は医薬品としてのホルモン製剤であり、食品素材のように毎日摂取することができ、かつ安全な各種骨関節疾患を予防及び改善する物質については検討されていないのが現状である。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 上記するように、骨粗鬆症、骨折、腰痛及びリウマチなどの骨関節疾患は大きな社会問題になっており、これらの症状を予防及び改善する方法が求められている。本発明者らは、各種骨関節疾患の予防及び改善効果を有する物質を得るべく鋭意研究を進めてきたところ、牛乳や牛脳中に含まれるセラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質、ガングリオシドなどのスフィンゴシン骨格を有する化合物に各種骨関節疾患を予防及び改善する効果があることを見出した。そして、カルシウム剤、ビタミンD、ビタミンKを加えることによりその効果が高まることを見出し、本発明を完成するに至った。したがって、本発明は、スフィンゴシン骨格を有する化合物を有効成分とする骨関節疾患の予防及び改善剤を提供すること、及びカルシウム剤、ビタミンD及びビタミンKから選ばれる一種以上の物質を加えた上記の骨関節疾患の予防及び改善剤を提供することを課題とする。また、本発明は、スフィンゴシン骨格を有する化合物を配合して骨関節疾患の予防及び改善効果を賦与した飲食品又は飼料を提供すること、及びカルシウム剤、ビタミンD及びビタミンKから選ばれる一種以上の物質を加えた上記の飲食品又は飼料を提供することを課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明では、セラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質、ガングリオシドなどのスフィンゴシン骨格を有する化合物を骨関節疾患の予防及び改善剤の有効成分として使用する。また、本発明では、セラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質、ガングリオシドなどのスフィンゴシン骨格を有する化合物を飲食品や飼料に配合して骨関節疾患の予防及び改善効果を賦与する。スフィンゴシンは、スフィンゴ脂質を構成する長鎖塩基の1種であり、生体中に広く分布している。スフィンゴシンは、生体内で、脂肪酸と酸アミド結合してセラミドを構成し、スフィンゴ脂質の骨格を成している。

【0006】 スフィンゴ脂質は、細胞膜を構成する成分であり、その大部分がスフィンゴ糖脂質やスフィンゴリン脂質として存在している。スフィンゴ脂質は、脳や神経系又は赤血球に多く含まれている。また、種々の食品中にも含まれているが、特に牛乳中に多く含まれている。スフィンゴ脂質の生理作用に関しては、非常に多くの報告がこれまでになされてきている。例えば、スフィ

ンゴシン蛋白質リン酸化酵素Cを阻害すること、単球やマクロファージ系細胞の分化を促進する作用を有すること、上皮細胞成長因子(EGF)レセプターの機能を調節する作用を有することなどである。また、スフィンゴ脂質の中でも、ガングリオシドは、脳虚血障害やパーキンソン病による脳障害の治療にも応用されている。

【0007】スフィンゴシン骨格を有する化合物のセラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質、ガングリオシドなどの化合物は、化成品や動植物由来のものを使用すれば良い。そして、これらの化合物は、牛乳や牛脳などに含まれているので、生乳、粉乳、脱脂乳、還元乳などの牛乳や牛脳を原料とし、加熱、加塩、アルコール添加、イオン交換クロマトグラフィーやゲル濾過クロマトグラフィーなどの各種クロマトグラフィー、限外濾過(UF)などの処理を行うことにより得ることができる。なお、スフィンゴシン骨格を有する化合物は熱安定性を有するので、特に飲食品や飼料などに配合する際に極めて取扱いし易い。また、本発明では、上記したスフィンゴシン骨格を有する化合物を有効成分とする骨関節疾患の予防及び改善剤の効果を高めるために、カルシウム剤、ビタミンD及びビタミンKから選ばれる一種以上の物質を加える。また、本発明では、上記したスフィンゴシン骨格を有する化合物を配合して骨関節疾患の予防及び改善効果を賦与した飲食品や飼料の効果を高めるために、カルシウム剤、ビタミンD及びビタミンKから選ばれる一種以上の物質を加える。本発明で使用するカルシウム剤としては、例えば、塩化カルシウム、炭酸カルシウム、乳酸カルシウムなどのカルシウム塩、卵殻、あるいは牛乳由来のカルシウム含有組成物などを挙げることができるが、吸収性の良いカルシウム塩を使用することが望ましい。また、ビタミンDやビタミンKなどの骨に有効な成分を配合することが望ましい。このようなカルシウム剤やビタミン類は、スフィンゴシン骨格を有する化合物と作用機作が異なり、骨に対して相乗的に効果を示す。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明においては、化成品、あるいは牛乳や牛脳由来のスフィンゴシン骨格を有するセラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質、ガングリオシドなどの化合物を有効成分として、骨関節疾患の予防及び改善剤を調製し、さらに、カルシウム剤、ビタミンD及びビタミンKから選ばれる一種以上の物質を加えて、骨関節疾患の予防及び改善剤を調製する。また、本発明においては、化成品、あるいは牛乳や牛脳由来のスフィンゴシン骨格を有するセラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質、ガングリオシドなどの化合物を配合して骨関節疾患の予防及び改善効果を賦与した飲食品又は飼料を調製し、さらに、カルシウム剤、ビタミンD及びビタミンKから選ばれる一種以上の物質を加えて、骨関節疾患の予防及び改善効果を賦与した飲食品又

は飼料を調製する。

【0009】本発明においては、スフィンゴシン骨格を有する化合物を成人一人一日当たり $1\text{ }\mu\text{g} \sim 10\text{ mg}$ を数回に分けて摂取することにより、骨粗鬆症、骨折、腰痛及びリウマチなどの骨関節疾患を予防及び改善することができる。したがって、それらの量を摂取することができるよう、スフィンゴシン骨格を有する化合物を飲食品や飼料に配合すれば良い。さらに、カルシウム剤、ビタミンD及びビタミンKから選ばれる一種以上の物質を適量加えることにより、骨関節疾患の予防及び改善効果を高めることができる。なお、飲食品としては、例えば、牛乳、乳飲料、ジュース、ゼリー、ビスケット、パン、麺、ソーセージなどを挙げることができる。次に、実施例及び試験例を示し、本発明を詳細に説明する。

【0010】

【参考例1】牛乳由来のガングリオシドの調製；公知のガングリオシド調製法(特開昭63-369992号公報)に従い、牛乳由来のガングリオシドを調製した。すなわち、ガングリオシドを含む乳質物質に蛋白質分解酵素のトリプシンを40°Cで15時間作用させて蛋白質を分解した後、得られた蛋白質分解物溶液を分子量分画10,000の膜で透析して、ガングリオシド高含有画分を得た。このガングリオシド高含有画分を凍結乾燥した後、クロロホルムメタノール(1:1)溶液に溶解し、この溶液を陰イオン交換樹脂(DEAE-Sephadexアセテート型、ファルマシア社製)に通液して、ガングリオシドを吸着させた。次に、陰イオン交換樹脂をクロロホルムメタノール(1:1)溶液で洗浄した後、0.1M酢酸ナトリウム水溶液-メタノール溶液でガングリオシドを溶出した。そして、溶出液を減圧乾固した後、透析して脱塩し、凍結乾燥した。このようにして得られたガングリオシド画分(画分A)を薄層クロマトグラフィー(レゾルシノール法)で検出したところ、ガングリオシドGM3:ガングリオシドGD3:ガングリオシドGT3=10:90:1であった。さらに、画分Aを分画した。すなわち、クロロホルムメタノール(8:8(v/v))溶液に画分Aを懸濁し、シリカゲル(イアトロビーズ、iatron laboratory社製)カラムに添加して、8:2(v/v)から2:8(v/v)までのクロロホルムメタノール溶液でグラジエント溶出し、ガングリオシドGM3画分(画分B)、ガングリオシドGD3画分(画分C)及びガングリオシドGT3画分(画分D)に分画した。このようにして得られた各ガングリオシド画分を薄層クロマトグラフィー(レゾルシノール法)で検出したところ、純度は95%以上であった。

【0011】

【参考例2】牛脳由来のガングリオシドの調製；一般に広く行われているガングリオシド調製法に従い、牛脳由来のガングリオシドを調製した。すなわち、屠殺直後に摘出し、-20°Cで保存しておいた牛脳5kgを凍結乾燥し

た後、ミキサーで粗い粉末とし、メタノール 10 l を加えて60℃に加熱して30分放置し、ガングリオシドを含む画分を抽出し、抽出後、直ぐに吸引濾過して得られた濾液を-10℃で一晩放置した。そして、生成した沈殿を手早く吸引濾過して回収し、Folch分配した後、その上層を減圧濃縮し、凍結乾燥した。このようにして得られた画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで処理して、中性脂質及びスルファチドを分離し、ガングリオシド画分（画分E）4.87gを得た。このようにして得られた画分Eには、ガングリオシドG D1a、ガングリオシドGM1、ガングリオシドG D1b、ガングリオシドG T1bなどが含まれていた。さらに、画分Eを分画した。すなわち、Q-Sepharose カラムに、クロロホルム-メタノール水（30：60：8）溶液 500mlに溶解した画分Eを添加して、クロロホルム-メタノール水（30：60：8）溶液 3 lからクロロホルム-メタノール-4M酢酸ナトリウム水溶液（30：60：8）溶液 3 lまでグラジェント溶出し、ガングリオシドG D1a（画分F）1,220mg、ガングリオシドGM1（画分G）102mg、ガングリオシドG D1b（画分H）451mg、ガングリオシドG T1b（画分I）540mgを得た。

【0012】

【参考例3】牛乳由来のスフィンゴミエリンの調製；牛乳からスフィンゴミエリンを調製した。すなわち、バターオイルを製造する際に排出されるバターセーラム10kgを凍結乾燥した後、これを60℃でメタノール90 lに溶解した。室温で12時間放置した後、生成した沈殿が混入しないように上清を回収し、減圧濃縮してメタノールを除去した。得られた固形物を脱イオン水 10 l に溶解した後、限外濾過して低分子画分を除去し、凍結乾燥して高分子画分を得た。この高分子画分は600gであり、この高分子画分に含まれるスフィンゴミエリン含量は15.2%であった。さらに、スフィンゴミエリンを精製するために、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。すなわち、シリカゲルカラム 10 l に、スフィンゴミエリンを含む高分子画分500gを溶解したクロロホルム：メタノール（9：1）溶液を添加した。そして、メタノール濃度を高めてグラジェント溶出し、スフィンゴミエリン画分（画分J）37.3 gを得た。このようにして得られたスフィンゴミエリン画分は純度98%以上であった。

【0013】

【参考例4】牛乳由来のセラミドの調製；参考例1で得られたガングリオシド画分（画分A）からセラミドを調製した。すなわち、酢酸緩衝液(pH 5.5)中で、画分A 20gに対して Endoglycoceramidase(宝酒造社製) 500Uを添加し、12時間反応させた。反応後、反応液を Folch 分配して脂質画分を回収し、陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーで糖脂質を除去した。そして、オクタデシルシリルカラムクロマトグラフィーでセラミド部分を精製し、窒素を吹き付け乾固させた。このようにして、

セラミド画分（画分K）6gを得た。このセラミド画分は純度98%以上であった。

【0014】

【試験例1】スフィンゴシン骨格を有する化合物の骨吸収抑制効果；生後10～20日齢のICR系マウスの長管骨を摘出し、軟組織を除去した後、5%牛胎児血清を含む α -MEM溶液中で骨を機械的に細切し、破骨細胞を含む全骨髓細胞を得た。この細胞を象牙片の上に、約 2×10^6 の細胞を5%牛胎児血清を含む α -MEM溶液でスポットした。数時間後、スフィンゴシン骨格を有する化合物を50ng/mlの濃度となるように添加した5%牛胎児血清を含む α -MEM溶液を加え、5%二酸化炭素存在下、37℃で5日間培養し、破骨細胞の骨吸収活性を調べた。培養後、象牙片上の細胞を剥がしてヘマトキシリン染色し、画像解析装置（PIASLA-555、PIAS社製）により画像解析して、骨吸収窓(pit) 数を測定した。そして、次式で定義される骨吸収活性(%)を求め、骨吸収抑制効果を評価した。

$$\text{骨吸収活性(%)} = (\text{骨吸収窓数} / \text{無添加群の骨吸収窓数}) \times 100$$

なお、スフィンゴシン骨格を有する化合物としては、参考例1～4で得られた画分A～Kを使用した。その結果を表1に示す。

【0015】

【表1】

試験試料	骨吸収活性(%, ±SD)
画分A	53.4 ±7.8
画分B	56.5 ±8.4
画分C	46.8 ±5.7
画分D	67.6 ±4.5
画分E	54.3 ±7.5
画分F	51.5 ±6.4
画分G	57.3 ±5.1
画分H	50.6 ±4.8
画分I	65.3 ±3.4
画分J	42.3 ±4.6
画分K	50.5 ±3.9

【0016】スフィンゴシン骨格を有する化合物を添加した培地で培養すると、無添加の培地で培養した時に比べて、骨吸収が抑制されており、スフィンゴシン骨格を有する化合物が優れた骨吸収抑制効果を示すことが確認できた。

【0017】

【試験例2】スフィンゴシン骨格を有する化合物の骨吸収防止及び骨強化作用；参考例1で得られた画分A及び参考例3で得られた画分Jについて、骨粗鬆症モデルラットを用いた投与試験により、骨吸収防止効果を調べ

た。また、画分A及びJに吸収性の良い牛乳由来のカルシウム剤（乳Ca：特開平4-306622号公報参照）及びビタミンD（VD）200IUを加えて同様の試験を行った。試験動物に投与した飼料の組成は、表2に示すように、各成分を配合した原料に必要に応じてスフィンゴシン骨格を有する化合物を添加した。飼料中のカルシウム量とリ

ン量は共に全ての群で飼料100g当たり300mgになるようになり、カルシウム：リン比を1:1とした。そして、この飼料を0.3%添加して試験を行った。

【0018】

【表2】

対照	シャム	画分		画分+乳Ca ²⁾ +VD ³⁾	
		A	J	A	J
蔗糖	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
カゼイン	20.0	20.0	18.0	18.0	18.0
コーンスターチ	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
セルロース	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
トウモロコシ油	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
ビタミン混合 (コリン含む)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
ミネラル混合	4.0 ¹⁾	4.0 ¹⁾	4.0 ¹⁾	4.0 ¹⁾	4.0 ²⁾

	(単位:g/100g)	
画分A	—	—
画分J	—	—

	(単位:重量%)	
画分A	0.0001	—
画分J	—	0.0001

【0019】1) 炭酸カルシウムをカルシウム源とした。

- 2) 牛乳由来のカルシウム剤をカルシウム源とした。
- 3) ビタミンD 200IUを配合した。

試験動物として、32週齢のSD系雌性ラットを用いた。骨粗鬆症モデルラットは、一週間予備飼育した後に卵巢摘出手術を施し、低カルシウム食で2ヶ月間飼育することにより作成した。また、疑似手術を施し、卵巢を摘出しないシャムラットも7匹作成した。投与試験は、1試験群7匹に群分けし、表2の試験食を1ヶ月間投与して行った。試験食投与後、各実験群のラットの大腿骨を摘出し、骨塩量測定装置で骨塩量を測定し、破断特性測定装置で骨強度を測定した。その結果を表3及び表4に示す。

【0020】

【表3】

	骨塩量 (mg, ± SD)
シャム	127.4 ± 3.5*
対照	109.5 ± 4.1
画分A	117.2 ± 3.8*
画分J	119.3 ± 4.5*
画分A+乳Ca+VD	126.1 ± 4.9*
画分J+乳Ca+VD	121.7 ± 4.4*

【0021】^{*}対照群に対する有意差あり ($P < 0.05$)。大腿骨の骨塩量は、対照群に較べて、画分A及びJ群で統計的に有意に高い値を示した。このことから、スフィンゴシン骨格を有する化合物には骨吸収防止効果があることが判った。また、吸収性の良い乳カルシウム及びビタミンDを加えることにより、その効果はさらに増大することが判った。

【0022】

【表4】

	骨破断力 (10 ⁶ dyn)
シャム	12.8 ± 2.9*
対照	6.4 ± 1.7
画分A	8.2 ± 1.5*

画分 J	8.4 ± 1.9*
画分 A + 乳Ca + VD	9.1 ± 2.1*
画分 J + 乳Ca + VD	9.5 ± 2.4*

* 対照群に対して有意差あり ($P < 0.05$)

【0023】表4に示したように、大腿骨の破断力は対照群に較べて、画分A及びJ群で統計的に有意に高い値を示した。このことから、スフィンゴシン骨格を有する化合物には骨強化作用があることが判った。また、吸収性の良い乳カルシウム及びビタミンDを加えることにより、その効果はさらに増大することが判った。なお、ビタミンDに代えてビタミンKを加えても、同様の結果であった。

【0024】

【試験例3】表5の配合の原料に牛乳由来のガングリオシド0.000008重量%及びビタミンD 200IUを加えて混合して容器に充填し、加熱滅菌して飲料を製造した。なお、対照群では、表5の配合の原料にアルブミン0.00005重量%及びビタミンD 200IUを加えた。

【0025】

【表5】

結晶ブドウ糖	15.0 (重量%)
カルシウム	0.5
水	74.0

【0026】変形性関節症（関節の開裂の収縮）の女性患者20人をボランティアとして、10人ずつ2群に分け、上記の飲料を1ヶ月間飲用してもらい、飲用開始前と飲用終了後に、骨吸収の骨代謝マーカーである尿中デオキシピリジノリン量を測定して評価した。また、問診を行って症状の変化を調べた。その結果を表6及び表7に示す。

【0027】

【表6】

デオキシピリジノリン減少量 (nM/mM Cr)

対照群	0.35 ± 0.4
試験群	0.84 ± 0.3*

* 対照群に対して有意差あり ($P < 0.05$)

【0028】表6に示すように、カルシウム及びビタミンを配合した対照群においてもデオキシピリジノリン量は減少していたが、試験群ではさらに大きく減少していた。この結果から、スフィンゴシン骨格を有する化合物

を配合した飲料を飲用することにより、骨の破壊による骨吸収が極めてよく抑えられていることが判った。

【0029】

【表7】

	対照群		試験群	
	開始前	終了後	開始前	終了後
物理的圧迫の関節痛	10	9	10	10
動作時の関節痛	5	5	5	1
就寝時の関節痛	6	6	7	4
疲労時の関節痛	9	8	8	4
脱力感	6	6	7	2
開裂全体の関節痛	9	8	9	4

(単位：人／10人)

【実施例1】飲料の製造；表8の配合の原料に牛乳由来のガングリオシド0.00005重量%及びビタミンD 200IUを加えて混合して容器に充填し、加熱滅菌して、骨関節疾患の予防及び改善効果を賦与した飲料を製造した。

【0032】

【表8】

【0030】表7に示すように、関節痛に関しても、スフィンゴシン骨格を有する化合物を配合した飲料を飲用することにより、痛みが軽減していることが判った。なお、スフィンゴシン骨格を有する化合物を配合したチーズでも同様の傾向が見られた。

【0031】

混合異性化糖	15.0 (重量%)
果汁	10.0
クエン酸	0.5
香料	0.1
カルシウム	0.5
水	73.9

【0033】

【実施例2】錠剤の製造；表9の配合の原料に牛乳由来のガングリオシド0.0001重量%及びビタミンD 200IUを加えて混合し、加圧成型して、骨関節疾患の予防及び改善効果を賦与した錠剤を製造した。

【0034】

【表9】

含水結晶ブドウ糖	93.5 (重量%)
カルシウム	5.0
シュガーエステル	1.0
香料	0.5

【0035】

【実施例3】ビスケットの製造；表10の配合の原料に牛脳由来のガングリオシド0.00001重量%を加えて混合してドウを作成し、成型した後、ぱい焼して、骨関節疾患の予防及び改善効果を賦与したビスケットを製造した。

【0036】

【表10】

小麦粉	50.0 (重量%)
砂糖	20.0
食塩	0.5
マーガリン	12.5

卵	12.5
水	3.7
炭酸水素ナトリウム	0.1
重炭酸アンモニウム	0.2
炭酸カルシウム	0.5

【0037】

【実施例4】ゼリーの製造；表11の配合の原料に牛乳由来のスフィンゴミエリン0.00001重量%を加えて混合し、容器に充填した後、加熱滅菌して、骨関節疾患の予防及び改善効果を賦与したゼリーを製造した。

【0038】

【表11】

果糖	20.0 (重量%)
グラニュー糖	15.0
水飴	5.0
寒天	1.0
香料	0.1
カルシウム	0.1
水	58.8

【0039】

【実施例5】プロセスチーズの製造；表12の配合の原料に牛乳由来のガングリオシド0.0001重量%を加えて混合し、乳化温度85°Cで乳化して、骨関節疾患の予防及び改善効果を賦与したプロセスチーズを製造した。

【0040】

【表12】

ゴーダチーズ	43.0 (重量%)
チェダーチーズ	43.5
クエン酸ナトリウム	2.0
牛乳由来のカルシウム	1.0
水	10.5

【0041】

【実施例6】12%脱脂乳に90°Cで20分間加熱殺菌した後、ラクトバチルス・デルブルッキー・サブスピーシーズ・ブルガリクス(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)及びストレプトコッカス・サーモフィルス(*S. thermophilus*)をそれぞれ接種し、二種類のスターターカルチャーを得た。そして、牛乳を主体とするヨーグルトミックスを主成分として、表13の配合の原料に牛脳由来のガングリオシド0.00001重量%を加えて混合した後、常法に従って発酵冷却を行い、骨関節疾患の予防及び改善効果を賦与したヨーグルトを製造した。

【0042】

【表13】

ヨーグルトミックス	97.0 (重量%)
培養物 (L. bulgaricus)	1.5
培養物 (S. thermophilus)	1.5

【0043】

【実施例7】ドッグフードの製造；表14の配合の原料に牛乳由来のガングリオシド0.0002重量%を加えて混合し、骨関節疾患の予防及び改善効果を賦与したドッグフード（イヌ飼育用飼料）を製造した。

【0044】

【表14】

大豆粕	12.0 (重量%)
脱脂粉乳	14.0
大豆油	4.0
コーン油	2.0
パーム油	28.0
トウモロコシ澱粉	15.0
小麦粉	9.0
ふすま	2.0

ビタミン混合物	9.0
ミネラル混合物	2.0
セルロース	3.0

【0045】

【発明の効果】セラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質、ガングリオシドなどのスフィンゴシン骨格を有する化合物を有効成分とすることにより、骨粗鬆症、骨折、腰痛、リウマチなどの骨関節疾患の予防及び改善剤を提供することができる。また、セラミド、スフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質、ガングリオシドなどのスフィンゴシン骨格を有する化合物を配合することにより、骨粗鬆症、骨折、腰痛、リウマチなどの骨関節疾患の予防及び改善効果を賦与した飲食品又は飼料を提供することができる。さらに、上記した骨関節疾患の予防及び改善剤に、カルシウム剤、ビタミンD、ビタミンKを加えることにより、あるいは上記した骨関節疾患の予防及び改善効果を賦与した飲食品又は飼料に、カルシウム剤、ビタミンD、ビタミンKを加えることにより、それぞれの効果を高めることができる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷

A 61 P 19/10

識別記号

F I

テーマコード（参考）

A 61 P 19/10

(72) 発明者 川上 浩

埼玉県川越市藤間204-5

(72) 発明者 青江 誠一郎

埼玉県狭山市新狭山2-8-9ワコーア第二
新狭山マンション406

F ターム(参考) 4B018 LB01 LB02 LB06 LB07 LB08

MD04 MD09 MD18 MD23 MD27

MD28 MD30 MD52 ME05 MF02

4C086 AA01 AA02 DA14 DA42 EA05

EA06 HA04 MA01 MA02 MA04

MA08 MA52 NA05 NA14 ZA96

ZA97 ZB15 ZC20 ZC61 ZC75

4C206 AA01 AA02 CB28 FA03 GA23

GA25 MA01 MA02 MA04 MA22

MA28 MA30 MA72 NA05 NA14

ZA96 ZA97 ZB15 ZC20 ZC61

ZC75